

及其比例明显增加,相对分子质量分布范围变窄,且浸出物颗粒高度变小,大小分布均匀,说明微波对高分子化合物有分散作用,能够改变浸出物相对分子质量的分布特征。

本研究属于液-固浸取过程的一种,即从天然植物性物料中分离有效成分。植物性生物材料均由细胞组成,可溶性物质通常存在于细胞及其组织内。由于本实验采用浸泡工艺,所以不考虑溶剂进入固体的时间。溶质通过固体和溶剂到达固体表面的扩散速率才是浸取过程的主要阶段。为了简化问题,假定生物材料固体骨架为惰性多孔固体结构,固体的微孔中是溶质和溶剂,则通过多孔固体的扩散可应用有效扩散系数来描述^[7],且有效扩散系数与溶质相对分子质量的三分之一成反比。因此,当归浸出物中多糖等大分子有效成分相对分子质量越大,分子体积越大,越不利于其从植物体中浸出。

结合传统回流和微波辅助提取的相对分子质量分布,以及浸出物原子力显微特征可知,微波存在分散作用,在提取当归水溶性溶质过程中起到促进质量传递的作用。

参考文献:

- [1] Pare J R J, Belanger J M R. Microwave-assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory [J]. *Trends Anal Chem*, 1994, 13: 176-184.
- [2] 郝金玉,韩伟,邓修. 新鲜银杏叶经微波辅助提取后微观结构的变化[J]. 中草药, 2002, 33(8): 739-781.
- [3] 杨俊红,张恒春,郭锦棠,等. 微波作用对黄芪水提液分子量分布特征的影响[J]. 工程热物理学报, 2007, 28(4): 649-651.
- [4] 周俊. 中药复方-天然组合化学库与多靶作用机理[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 2(2): 67.
- [5] 孙润广,张静. 甘草多糖螺旋结构的原子力显微镜研究[J]. 化学学报, 2006, 64(24): 2467-2472.
- [6] 陈卫祥,赵杰,刘昭林. XC-72 碳和碳纳米管负载 PtRu 纳米粒子的微波快速合成及其对甲醇的电化学氧化[J]. 化学学报, 2004, 62(17): 1590-1594.
- [7] 金克普利斯 J. 传递过程与单元操作[M]. 北京:清华大学出版社, 1985.

石蒜中加兰他敏的超临界 CO₂ 萃取工艺研究

耿中峰,吕惠生,张敏华*

(绿色合成与转化教育部重点实验室 天津大学石油化工技术开发中心,天津 300072)

摘要:目的 考察影响石蒜中加兰他敏超临界 CO₂ 萃取的因素。方法 采用单因素试验和正交试验考察超临界萃取条件,以加兰他敏的提取率为考察指标,对影响加兰他敏提取率的温度、压力、CO₂ 流量、夹带剂进行了研究。结果 提取加兰他敏最佳超临界条件:萃取温度 65 ℃,压力 40 MPa,CO₂ 流量 20 g/min,夹带剂为 90%乙醇溶液,流量 5 mL/min,萃取时间为 3 h。在上述工艺条件下,加兰他敏提取率可达 0.014 5%。结论 超临界 CO₂ 萃取工艺适合于石蒜中加兰他敏的提取。

关键词:石蒜;加兰他敏;超临界 CO₂ 萃取;正交试验

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0543-04

加兰他敏是一种四环生物碱,属于具有可逆作用的胆碱酯酶抑制剂,易透过血脑屏障,产生较强的中枢作用,类似毒扁豆碱和新斯的明。但是,其有独特的特性,可与吗啡相比的强镇痛作用。作为胆碱酯酶抑制剂,加兰他敏的治疗范围比毒扁豆碱及新斯的明的宽 3~6 倍,而且毒性小。加兰他敏被用于治疗脊髓灰质炎和各种神经系统疾病,但主要用于治疗青光眼和作为使用箭毒后的解毒药。近年来加兰他敏用于治疗老年性痴呆、酒精依赖、尼古丁依赖引起了广大研究者的兴趣^[1]。

加兰他敏主要是从植物中提取^[2]。石蒜为多年生

草本植物,其鳞茎中含有加兰他敏^[3,4]。从石蒜中提取加兰他敏的传统方法是有机溶剂法。传统提取方法步骤多、排污量大,要使用大量的酸性或碱性试剂,不可避免的溶剂残留会使其利用受到限制,越来越不适应今日趋严格的环保要求。不少研究者开发了改进的加兰他敏提取工艺^[5,6]。虽然这些改进的方法在一定程度上完善了传统提取工艺,但没有从根本上解决有机溶剂消耗大、溶剂残留多、环境污染严重等问题。对石蒜中加兰他敏的高效提取和分离研究具有非常重要的现实意义。因此,本实验对石蒜中加兰他敏的超临界 CO₂ 萃取工艺进行了研究。

收稿日期:2007-06-16

作者简介:耿中峰(1981—),男,河北赵县人,博士研究生,主要从事超临界流体技术方面的研究。

* 通讯作者 张敏华 Tel:(022)27406119 E-mail: mhzhang@tju.edu.cn

1 原料及仪器

所采用的原料为黄花石蒜 *Lycoris aurea* (L' Her.) Herb., 产地湖南, 由湖南省沅陵县三新公司鉴定; 氢溴酸加兰他敏对照品 (HPLC 级), 湖南株洲大有生物科技有限公司; 无水乙醇 (分析纯), CO_2 质量分数为 99.9%, 天津市大茂化学试剂厂。

SFE-2000 型超临界萃取装置, 美国 Thar 公司; Libror AEG200 型电子天平, 岛津公司; Agilent 1100 高压液相色谱仪, Agilent 公司; KQ-200DF 型超声清洗仪, 昆山超声仪器有限公司; FE80 型万能粉碎机, 齐家务科学仪器厂。

2 方法与结果

2.1 超临界 CO_2 萃取流程: 将 50 g 一定目数、碱化后的石蒜粉放入 500 mL 萃取釜中。 CO_2 和夹带剂分别用二台高压计量泵输入系统; 系统压力由这两台泵提供, 并通过萃取釜后的自动背压阀控制。由泵出来的 CO_2 和夹带剂经混合器混合后进入电加热器, 进行预热, 使之达到超临界状态。萃取釜也配有电加热套和保温夹套, 便于控制萃取温度。在釜内, 萃取物与超临界流体在一定的温度、压力下进行复杂的质量传递和热量传递。溶有加兰他敏等萃取物的超临界流体经自动背压阀卸压后进入收集釜, 釜内压力由其后手动背压阀控制。二台泵、二个电加热器以及自动背压阀都通过计算机自动控制。

2.2 加兰他敏的 HPLC 法测定^[6-8]

2.2.1 色谱条件: Zorbax C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 0.46 mm, 0.5 μm); 以水-甲醇-冰醋酸 (91:8:1) 为流动相; 体积流量为 1 mL/min; 选择柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 1 μL ; 检测波长: 280 nm。

2.2.2 标准曲线的制备: 准确称取氢溴酸加兰他敏对照品 50 mg 放入 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解、定容, 制成 0.5 mg/mL 贮备液。分别取 1、2、3、4、5 mL 贮备液加甲醇稀释至 10 mL。再取 1、2 mL 贮备液稀释至 100 mL, 制成 0.005、0.01 mg/mL 对照品溶液, 依次进样 1 μL , 测定。以峰面积对氢溴酸加兰他敏质量浓度进行线性回归, 得回归方程 $Y = 405.148456X - 0.657729$, $r = 0.99965$ 。

2.2.3 样品测定: 从提取液中移取 20 mL 置于锥形瓶中, 加入氢溴酸酸化至 pH 值为 2, 然后滴加三乙胺至中性, 滤过。称量待测样品溶液, 依次进样 1 μL , 进行 HPLC 测定。外标法计算萃取液中加入他敏。并计算加兰他敏的提取率 (加兰他敏的提取率 = 萃取液氢溴酸化后氢溴酸加兰他敏的质量 / 石蒜原料的质量 $\times 100\%$)。

2.3 单因素考察试验

2.3.1 粉碎粒度和萃取时间的影响: 将原料粉碎, 筛分为不同的粒度。采用超临界萃取工艺考察原料粒度对加兰他敏提取率的影响, 从而选择合适的原料粉碎粒度。分别选取粒度为 20 目以下、20~40 目、40~60 目和 60 目以上的 4 种原料进行试验, 结果见图 1。随着目数增大加兰他敏的提取率逐渐上升, 但增大到 40~60 目以后, 粒度对提取率的影响变小, 因此选择石蒜原料的粒度为 40~60 目, 最大萃取率为 0.0023%。同时可知, 随着萃取时间的延长, 各目数下的提取率都在增加, 当萃取时间达到 3 h 后, 提取率的增长变得很缓慢, 认为萃取完全, 因此确定萃取时间为 3 h。

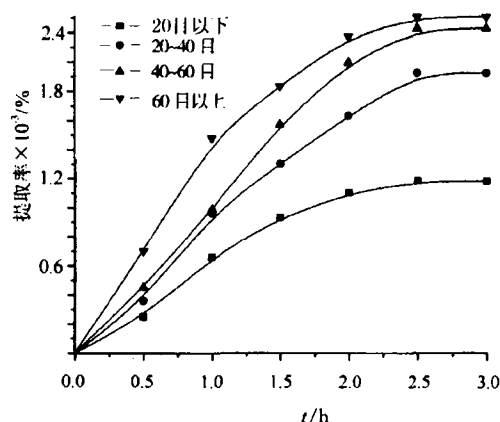


图1 粉碎粒度对加兰他敏提取率的影响

Fig. 1 Effect of pulverizing granularity on extracting rate of galanthamine

2.3.2 碱化条件: 生物碱多存在于植物细胞的液胞中, 与液胞中的柠檬酸等有机酸结合成盐, 这使得生物碱在超临界 CO_2 流体中的溶解度减小, 降低萃取效率, 加大萃取成本。加入碱化剂碱化, 通过离子置换反应, 使生物碱游离出来, 可以改善萃取效果。分别选择碱化剂三乙胺、氨水作碱化剂碱化样品。将碱化剂配制成 pH 值为 12 的溶液, 分别将 50 g 石蒜粉放入其中浸泡, 过夜烘干, 采用超临界方法进行萃取, 结果当样品未碱化时, 加兰他敏的提取率为 0.00147%, 采用三乙胺碱化后, 加兰他敏的提取率为 0.00189%, 比不加碱化剂时加兰他敏的提取率提高了 28.6%; 而采用氨水碱化后, 加兰他敏提取率不但没有提高, 反而降低了, 仅为 0.00086%。因此选择三乙胺作为碱化剂, 能取得较好的碱化效果。

2.3.3 夹带剂的选择: 超临界萃取过程中使用的夹带剂多为低级醇类和烃类, 要求既能与在中等压力和温度下混溶, 又能与众多有机物相溶。夹带剂可以有效地改善超临界 CO_2 的极性, 大大提高溶质在其

中的溶解度。对于有一定极性的待萃物,选择夹带剂时,还要考虑到与待萃物形成氢键等特殊分子间作用的能力大小。加兰他敏是一种生物碱,有一定的极性。本实验采用索氏提取法,以甲醇、乙醇、丙酮和醋酸乙酯作为夹带剂的筛选对象,通过加兰他敏提取率的比较选择合适的有机溶剂作为超临界萃取试验的夹带剂,萃取时间为 6 h,结果加兰他敏提取率分别为 0.010 1%、0.010 0%、0.001 1%。可以看出,加兰他敏提取率由高到低的顺序为:甲醇 $\approx$ 乙醇 $>$ 醋酸乙酯 $>$ 丙酮。甲醇和乙醇能与加兰他敏形成较强的氢键作用,加兰他敏在这两种溶剂中的溶解度较大,加兰他敏的提取率高,两者对加兰他敏的提取率相近。考虑到甲醇的毒性,选择乙醇作为从石蒜中提取加兰他敏的夹带剂。

2.3.4 夹带剂中含水量影响:加兰他敏是一种叔胺碱,无论是以游离状态还是以有机酸盐的形式存在,均能溶于水,水的加入可以提高其提取率。因此,选择含水 0.5%、10%、20%、30% 的乙醇水溶液作为夹带剂,采用超临界法进行试验,温度为 60 $^{\circ}\text{C}$,压力为 30 MPa,萃取时间 2 h, CO_2 流量为 20 g/min,夹带剂流量为 3 mL/min。结果加兰他敏的提取率分别为 0.003 9%、0.006 2%、0.007 1%、0.006 1%、0.004 7%。可见采用无水乙醇为夹带剂时,加兰他敏的提取率仅为 0.003 9%。随着夹带剂中含水量的增加,加兰他敏的提取率先上升后下降,当含水量为 10% 时提取率最高,达到 0.007 1%。因此,选择含水量为 10% 的乙醇作为夹带剂。

2.3.5 夹带剂流量的影响:其他操作条件相同时,选择夹带剂流量为 1、2、3、4、5、6 g/min 进行试验。结果加兰他敏的提取率分别为 0.003 5%、0.006 9%、0.007 1%、0.011 1%、0.013 5%、0.012 6%。可见随着夹带剂流量的增加,加兰他敏的提取率也随之增加,当夹带剂流量为 5 mL/min 时,提取率达到最大 0.013 5%。之后随着夹带剂流量的增加,提取率下降。因此,选择夹带剂流量为 5 mL/min。

2.4 超临界条件优化

2.4.1 正交试验:前面单因素试验已经确定了夹带剂(90%乙醇)、夹带剂流量(5 mL/min)和萃取时间(3 h)。采用正交试验来考察超临界 CO_2 流量、萃取压力及萃取温度对加兰他敏提取率的影响,确定超临界 CO_2 萃取加兰他敏的最优条件。本试验设计了以萃取压力(A)、萃取温度(B)和 CO_2 流量(C)为 3 个因素 4 个水平正交试验,因素水平安排见表 1。正交试验结果与分析见表 2、3。

表 1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素		
	A/C	B/MPa	C/(g $\cdot$ min $^{-1}$)
1	35	10	10
2	50	25	20
3	65	40	30
4	80	50	40

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A	B	C	提取率/%
1	35	10	10	0.007 2
2	35	25	20	0.007 8
3	35	40	30	0.007 4
4	35	50	40	0.006 6
5	50	10	20	0.007 6
6	50	25	10	0.102 0
7	50	40	40	0.009 2
8	50	50	30	0.009 7
9	65	10	30	0.011 0
10	65	25	40	0.010 4
11	65	40	10	0.011 4
12	65	50	20	0.012 8
13	80	10	40	0.010 7
14	80	25	30	0.010 9
15	80	40	20	0.012 6
16	80	50	10	0.010 2
I	0.007 25	0.009 13	0.009 75	
II	0.009 17	0.009 82	0.010 20	
III	0.011 40	0.010 15	0.009 75	
IV	0.011 10	0.009 83	0.009 23	
极差	0.415	0.102	0.000 97	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	方差比	显著性
A	0.445	3	13.09	$P<0.05$
B	0.022	3	0.647	
C	0.019	3	0.559	

$$F_{0.05}(3,6)=4.76 \quad F_{0.01}(3,6)=9.78$$

通过对表 3 的分析,确定超临界 CO_2 萃取压力、萃取温度和 CO_2 流量 3 个因素的最佳参数水平为 $A_3B_3C_2$,即萃取温度 65 $^{\circ}\text{C}$,压力 40 MPa, CO_2 流量为 20 g/min。在实验所考察的范围内,萃取温度对提取率的影响最明显,其次是压力, CO_2 流量对提取率的影响最小。各个因素按影响的显著性水平排列为 $A>B>C$,即对萃取温度条件的控制要求最严格,压力次之, CO_2 流量最为宽松。

2.4.2 影响因素分析:温度上升,加兰他敏的提取率增高。因为随着温度升高,加兰他敏的饱和蒸气压上升,有利于加兰他敏的提取;当温度从 65 $^{\circ}\text{C}$ 上升到 80 $^{\circ}\text{C}$ 时, CO_2 密度迅速下降,溶解能力减弱,密度

对溶解度的影响成为主导因素,加兰他敏的提取率开始下降。

压力升高,CO₂ 的密度增大,流体的溶解能力提高;压力升高又会使 CO₂ 的扩散系数和传质系数下降,不利于萃取。考虑压力影响时应综合考虑密度、扩散系数和传质系数的影响。

CO₂ 流量增大,颗粒内部待萃物与超临界 CO₂ 主体相之间的浓度差增加,传质推动力增大,提高了传质效率和萃取能力。随 CO₂ 流量的增加,加兰他敏提取率提高,但当 CO₂ 流量达到 20 g/min 以后,CO₂ 流量对提取率的影响不再明显。

2.4.3 验证试验:石蒜原料经过粉碎及碱化预处理,达到萃取平衡的时间缩短,提取率提高,完成整个萃取过程仅需 3 h;夹带剂的筛选过程中发现,以 90%乙醇水溶液作为夹带剂,流量为 5 mL/min 时,有较好的萃取效果;通过正交试验,以加兰他敏的提取率为目标函数,在选定的试验条件范围内,各因素对提取率的影响程度为:萃取温度>萃取压力>CO₂ 流量,适宜的工艺条件为:温度 65 °C,压力 40 MPa,CO₂ 流量 20 g/min;在上述的试验条件下进行 3 批样品的验证试验,可使加兰他敏的提取率达到 0.014 5%。

3 讨论

加兰他敏在石蒜中的总量由于产地不同有所差

别,本实验采用的药材中含加兰他敏量约为 0.015%,本实验为了计算精确,提取率采用了加兰他敏提取质量与石蒜投料质量之比。

所用夹带剂超临界条件的确定是本课题组用超临界相平衡装置测定数据^[9]基础上的结论,由于篇幅限制本实验不作报道。

参考文献:

- [1] Murray A, Raskind M. Update on Alzheimer drugs (galanthamine) [J]. *Neurologist*, 2003, 9(5): 235-240.
- [2] 上海医药工业研究院. 有机药物合成手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1976.
- [3] 洪山海,马广恩. 石蒜科生物碱的研究 3—紫花石蒜和其他两种石蒜中的生物碱和新生物碱紫花石蒜碱[J]. *药学学报*, 1964, 11(1): 1-14.
- [4] 洪山海,李静芳,马广恩. 石蒜科生物碱的研究 6—加兰他敏生产工艺及高含量植物的寻找[J]. *药学通报*, 1986, 14(5): 204-207.
- [5] 郑亚津,陈红辉. 从石蒜粗提物中分离高纯度加兰他敏的方法[P]. CN:01342010.9, 2004-04-21.
- [6] 张俊梅,王明新,申雅维,等. 石蒜科生物碱的研究 12—薄层色谱鉴别石蒜生物碱和高效液相色谱法测定加兰他敏的含量[J]. *药物分析杂志*, 1999, 19(6): 399-402.
- [7] Lo'pez S, Bastida J, Viladomat F. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of the five major alkaloids in *Narcissus confusus* [J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13, 311-315.
- [8] 钱南萍. HPLC 法测定氢溴酸加兰他敏分散片的含量[J]. *中国药刊*, 2003, 6(7): 430-431.
- [9] 肖关秀. 超临界萃取技术提取石蒜中加兰他敏的工艺研究[D]. 天津:天津大学,2005.

半夏及其炮制品的 X 射线衍射 Fourier 图谱对比研究

袁向辉,刘建利*,刘竹兰

(西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室 西北大学生命科学学院,陕西 西安 710069)

半夏是临床常用的有毒中药,生品对口腔和咽喉有强烈的刺激性,因而入药需经炮制。临床常用的是清半夏、姜半夏和法半夏 3 种炮制品,分别使用半夏生品经明矾溶液浸泡、加姜汁与明矾共煮和甘草石灰水浸泡的方法,炮制后刺激性消失。本实验采用 X 射线衍射 Fourier 指纹图谱法^[1]分析明矾溶液、姜汁、甘草石灰水以及加热等因素对半夏的影响,以鉴别生半夏及其炮制品,获得了生半夏与 3 种炮制品

的对照 X 衍射 Fourier 指纹图谱及特征标记峰值。

1 仪器与材料

日本理学公司 D/max—3c 改进型 X 射线衍射仪, Cu 辐射,石墨单色器,管压 35 kV,管流 40 mA,扫描速度 16 °/min,步长 0.02 °,2θ 扫描范围 5 °~50 °。

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎,经西安市药品检验所谢志民研究员鉴定。粉碎后过 200 目筛备用。

收稿日期:2007-06-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070905);陕西省重点实验室基金资助项目(03JS008, 04JS06, 05JS53)

作者简介:袁向辉(1983—),男,西北大学硕士研究生,研究方向为天然产物提取分离与结构修饰。

E-mail: yuanxianghui@126.com

* 通讯作者 刘建利 Tel: (029)88302411 E-mail: jlliu@nwwu.edu.cn